Aus der Chirurgischen Universitäts-Klinik in Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. M. Schwaiger

Tierexperimentelle Untersuchungen zur intravitalen Fluorochromierung verschiedener Gewebe mit Atebrin

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Gerd Helbing

aus Krakau

Marburg 1969

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus der Chirurgischen Universitäts-Klinik in Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. M. Schwaiger

Tierexperimentelle Untersuchungen zur intravitalen Fluorochromierung verschiedener Gewebe mit Atebrin

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Gerd Helbing

aus Krakau

Marburg 1969

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 29. Mai 1969

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. P. Karlson

Referent: Priv. Doz. Dr. med. K. Hupe

Correferent: Prof. Dr. med. H. Oehmig

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	Seite 1
2	Material	4
	2.1 Fluorochrom	4
	2.2 Tiere	4
	2.3 Tumoren	4
	2.4 Zellschäden	4
3	Methodik	5
	3.1 Primärfluoreszenz	6
	3.2 Sekundärfluoreszenz	6
	3.3 Sekundärfluoreszenz experimenteller Tumoren	6
	3.4 Sekundärfluoreszenz nach Gewebeschädigung	7
4	Ergebnisse	9
	4.1 Primärfluoreszenz	9
	4.2 Sekundärfluoreszenz	10
	4.3 Sekundärfluoreszenz experimenteller Tumoren	11
	4.4 Sekundärfluoreszenz nach Gewebeschädigung	13
5	Diskussion	18
6	Zusammenfassung	25
7	Literaturverzeichnis	26

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534909_0029

1 Einleitung

Die Früherfassung und -behandlung maligner Tumoren ist trotz aller Fortschritte auf den Gebieten der Operationstechnik, Strahlen-und cytostatischen Therapie wichtigste Maßnahme zur Heilung Geschwulstkranker geblieben. So nimmt es nicht wunder, wenn unzählige Versuche unternommen wurden, mit neuen Methoden maligne Tumoren bzw. Geschwulstzellen im Beginn ihres Wachstums zu entdecken und nachzuweisen. Von diesen Untersuchungstechniken haben jedoch nur wenige Eingang in die klinische Routine gefunden, wie z. B. die Anfertigung zytologischer Abstriche, ihre Aufarbeitung und Beurteilung nach den von PAPANICOLAOU aufgestellten Kriterien in der Gynäkologie. Andere diagnostische Hilfsmittel, etwa Änderungen der Serumeiweißzusammensetzung, helfen hier nicht weiter; sie sind entweder zu unspezifisch, oder Folgezustände schon länger bestehender Malignome, manifestieren sich daher erst zu spät und sind somit der übrigen klinischen-und röntgenologischen Frühdiagnostik unterlegen. Andere Verfahren wiederum sind technisch und methodisch zu aufwendig, um in der klinischen Routine eine Bedeutung erlangen zu können.

In den letzten Jahren wurde wiederholt berichtet, daß sich Zellen maligner Tumoren mit verschiedenen Fluorochromen intravital markieren lassen sollen. Durch eine Betrachtung im Fluoreszenzlicht soll so bereits makroskopisch eine schnelle und relativ sichere Unterscheidung von gut- und bösartigem Gewebe möglich sein. Von den vielen Substanzen, die auf ihre Eignung zur intravitalen Fluorochromierung getestet wurden, haben sich insbesondere Tetracycline und verschiedene Akridinfarbstoffe bewährt. So wurde 1951 eine Anreicherung von Atebrin im Gewebe maligner Tumoren durch Fluoreszenz makroskopisch nachgewiesen (CRAMER, BRILMAYER). Das mit Atebrin vorbehandelte Tumorgewebe habe deutlich gelblich fluoresziert und sich gut von der Umgebung abgegrenzt.

Schon 1929 waren fluoreszenzoptische Untersuchungen an Organpräparaten nach intravitaler Applikation eines Fluorochroms (Fluoreszein) vorgenommen worden (ELLINGER und HIRT). 1934 beschrieb HAMPERL ausführlich die feingewebliche Eigenfluoreszenz zahlreicher menschlicher Organe.

Inzwischen haben verschiedene Verfahren der Fluorochromierung Eingang in die Histologie gefunden, so vor allem die Anfärbung fixierter Schnitte mit diversen Fluorochromen. Man unterscheidet hierbei die Primär- oder Eigenfluoreszenz von der Sekundärfluoreszenz nach intra- oder postvitaler Anfärbung durch fluoreszierende Farbstoffe. Bei mikroskopischer Betrachtung im Fluoreszenzmikroskop wird das Objekt durch eine geeignete Lichtquelle angeleuchtet (Erregerstrahlung); sind entsprechende Substanzen vorhanden, dann emittieren diese Licht mit längerer Wellenlänge als die Erregerstrahlung (Fluoreszenzlicht). Je nach Wellenlänge der Erregerstrahlung spricht man von Röntgen-, UV- oder Blaulichtfluoreszenz. Unerwünschte Strahlen (z. B. das Objekt durchdringende UV-Strahlen) werden durch sogenannte Sperrfilter absorbiert und erreichen das Auge des Betrachters nicht.

Über den Wert der Tumordiagnostik vermittels intravitaler Fluorochromierung bestehen - ebenso wie bei Acranil und Tetracyclin - auch bei Atebrin (Quinacrin) sehr verschiedene Auffassungen: So halten verschiedene Autoren die Methode für relativ zuverlässig und brauchbar (ACKERMANN, BASTOS, HENNING und WITTE), andere zweifeln ihre Zuverlässigkeit an und lehnen sie als Beitrag zur Tumordiagnostik ab (ADERHOLT, REUSS WEISSBERG YOUNG). Anlässlich dieser unterschiedlichen Ergebnisse sollte nun in eigenen Versuchen an Ratten und z. T. Mäusen festgestellt werden,

1. welche Organe Primärfluoreszenz zeigen,
2. ob und in welchen Geweben Sekündärfluoreszenz durch Atebrin hervorgerufen werden kann,
3. ob experimentelle Tumoren den intravital verabreichten Farbstoff aufnehmen und gegebenenfalls speichern kann, und

4. ob Nekrosen eine vermehrte Atebrinaufnahme und -fluoreszenz zeigen.

2 Material

2.1 Fluorochrom

Atebrin = Quinacrin (6-chloro-9- [4-diethylamino- 1-methyl-butyl -amino] -2-methoxyacridin) von der Firma BAYER, Leverkusen. Dosis: 320 mg/kg Körpergewicht.

2.2 Tiere

200-250 g schwere weibliche Wistar-WU-Ratten.

20- 25 g schwere weibliche NMRI-Kißlegg-Mäuse.

2.3 Tumoren

2.3.1 Auf Ratten überimpft:

YOSHIDA-Sarkom, subcutan

JENSEN-Sarkom, subcutan

WALKER-BASF-Sarkom, subcutan

2.3.2 Auf Mäuse überimpft:

EHRLICH-Carcinom, intramuskulär

CROCKER-Sarkom, subcutan

Lymphosarkom 4946, subcutan

2.4 Zellschäden

2.4.1 Verkalkungen verschiedener Organe durch Vigantol (Vitamin D_3) intramuskulär

2.4.2 Leberzellschäden durch Tetrachlorkohlenstoff in den Magen

2.4.3 Lokale Muskelnekrosen durch Calciumchlorid-Lösung (5%ig) intramuskulär

2.4.4 Lokale Kältenekrosen mit Kohlensäureschnee

2.4.5 Nierenischämie durch Abklemmen des Gefäßpols

3 Methodik

Jeder der folgenden Versuche wurde mit mindestens sechs Tieren angesetzt. Bei Versuchsende wurden die Tiere durch Inhalieren von hochprozentigem Ätherdampf in einem geschlossenen Gefäß getötet. Das zu untersuchende Gewebe wurde dem Versuchstier sofort entnommen und makroskopisch beurteilt. Es wurde am gleichen Tag auf einem Gefriermikrotom unfixiert geschnitten und in Univert-Mountant der Firma Gurr Ltd., London bzw. in physiologischer Kochsalzlösung eingedeckt. Die Präparate wurden innerhalb von acht Stunden betrachtet und ihre Fluoreszenz beurteilt.

Die Auswertung geschah in einem Fluoreszenzmikroskop der Firma Carl Zeiss, Oberkochem, bei 80-bis 320-facher Vergrößerung. Eine Differenzierung mit noch stärkerer Vergrößerung war nicht möglich, da die unfixierten Gefrierschnitte nicht dünner als 8 µ geschnitten werden konnten. Als Lichtquelle diente ein Quecksilberhöchstdruckbrenner (HB O-200 W). Als Erregerfilter wurde die Kombination BG_{12} - UG_1 in den Strahlengang der Lichtquelle geschoben; sie filtern alle Frequenzen ausserhalb des UV-Bereichs weg, so daß das Spektrum der Erregerstrahlung auf eine Durchlaßfrequenz von 330 bis 400 mµ (das Maximum bei 380 mµ) eingeengt wird. Zwischen Objekt und Okular wurde eine Kombination aus den Sperrfiltern 41 und 53 geschoben, die Wellenlängen unter 410 mµ vollständig bzw. unter 530 mµ teilweise wegfiltern. Das UV-Licht wird so vollständig absorbiert und nur die Strahlung des Objektes, des sog. Selbstleuchters, gelangt als Fluoreszenzlicht bis zum Auge des Betrachters.

Im histologischen Präparat wurde bewertet,

1. ob Fluoreszenz vorhanden,
2. ob sie im Vergleich zum entsprechenden Präparat des Leerversuchs gleich oder stärker und

3. wo sie besonders lokalisiert war. Die Lokalisation war möglich

a) durch Einschalten von Phasenkontrastlicht zur Fluoreszenzmikroskopie und

b) durch den Vergleich mit gefärbten Präparaten. (Teile vom gleichen Gewebestück wurden für mindestens zwei Wochen in 70%igem Alkohol fixiert und in Paraffin eingebettet; davon wurden 5 µ dicke Schnitte mit Hämatoxilin-Eosin gefärbt und in Kanada-Balsam eingedeckt. Vom gleichen Block wurden auch entparaffinierte Schnitte ungefärbt in Univert-Mountant eingedeckt).

3.1 Primärfluoreszenz (= Eigenfluoreszenz)

Folgende Organe von Ratten wurden auf ihre Primärfluoreszenz hin untersucht: Gehirn, Herz, Lunge, Leber, Milz, Niere, Magen, Dünndarm, Dickdarm, Knochen Muskel und Haut.

3.2 Sekundärfluoreszenz (= Fluoreszenz nach Gabe von Atebrin)
Eine Tagesdosis von je 80 mg (= 2 ml einer 4%igen Lösung) wurde 6 Ratten 2 Tage lang mit einer Knopfkanüle in den Magen gefüllt. Nach einem Applikationsstopp für 48 Stunden wurden die Tiere getötet und die gleichen Organe wie unter 3.1 untersucht.

3.3 Sekundärfluoreszenz experimenteller Tumoren
Die Tumoren wurden Ratten bzw. Mäusen entnommen, die die Firma HOECHST, Frankfurt, zur Verfügung gestellt hatte. Dazu wurden die Tiere getötet, die Tumoren unter sterilen Bedingungen herauspräpariert, mit einer Schere mechanisch zerkleinert und in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Die so gewonnene Suspension wurde gesunden Ratten bzw. Mäusen subcutan in die Nackenregion oder intramuskulär in die Oberschenkelmuskulatur (im Einzelfall wie bei den Tumoren unter "Material" angegeben) injiziert. Sicht- oder tastbare Tumoren hatten sich nach durchschnittlich 5 Tagen

(EHRLICH-Carcinom), 6 Tagen (CROCKER-Sarkom 180), 7 Tagen (YOSHIDA-Sarkom), 11 Tagen (WALKER-Sarkom, Lymphosarkom 4946) und 14 Tagen (JENSEN-Sarkom) gebildet. Von dem Tag an wurden die Ratten zwei Tage lang mit 80 mg, die Mäuse zwei Tage lang mit 8 mg Tagesdosis Atebrin behandelt und nach einem Intervall von 48 Stunden getötet.

3.4 Sekundärfluoreszenz nach Gewebeschädigung

3.4.1 Hyperkalzämische Kalkablagerungen in Magen, Nieren und Lungen; 12 Tage lang wurden täglich 0,2 ml Vigantol forte (= 3 mg oder 120.000 I.E. Vitamin D_3) intramuskulär injiziert. Die Versuchstiere bekamen am 10. und 11. Tag zusätzlich Atebrin und wurden am 13. Tag getötet. Untersucht wurden Lunge, Magen, Nieren, Herz, Leber, Milz, Dünndarm, Dickdarm und Knochen.

3.4.2 Schädigung von Leber, Magenschleimhaut und Nierenepithel durch Tetrachlorkohlenstoff: 0,5 ml Tetrachlorkohlenstoff wurden durch eine Knopfkanüle direkt in den Rattenmagen appliziert. Am gleichen und am darauffolgenden Tag wurde Atebrin gegeben; nach 48 Stunden Intervall wurden die Tiere getötet. Untersucht wurden Magen, Leber und Nieren.

3.4.3 Lokale Muskelnekrosen durch einmalige intramuskuläre Injektion von Calciumchloridlösung: 0,5 ml einer 5%igen $CaCl_2$-Lösung wurden den Versuchstieren in die Oberschenkelmuskulatur injiziert. Die Atebrin-Applikation erfolgte am 2. und 3. Tag, am 5. Tag post injektione wurden die Tiere getötet. Untersucht wurde nur der lokal geschädigte Muskel.

3.4.4 Kältenekrosen durch Auflegen von Kohlensäureschnee: Die Bauchhöhle wurde jeweils in Äthernarkose eröffnet, und durch Auflegen von CO_2- Schneestückchen wurden in verschiedenen Versuchen Magen, Dünndarm, Dickdarm und Nieren 5 Minuten

lang durchgefroren. Danach wurde die Laparatomie-Wunde durch Zwirnnaht verschlossen. Am 1. und 2. Tag nach dem Eingriff wurde Atebrin gegeben, und nach weiteren 48 Stunden wurden die Tiere getötet. Untersucht wurden nur die lokal geschädigten Organe und das direkt angrenzende Gewebe.

3.4.5 Bei den Ratten mit Nieren-Kältenekrosen wurde in derselben Narkose die zweite Niere durch Abklemmen des Gefäßpoles einer 30 Minuten langen Ischämie ausgesetzt.

4 Ergebnisse

4.1 Primärfluoreszenz

Gehirn: In den Ganglienzellen der Hirnrinde waren feine, goldgelb fluoreszierende Körnchen vorhanden; im Kleinhirn fanden sie sich besonders ausgeprägt in den Purkinje-Zellen. Die weiße Substanz war dagegen völlig frei von Fluoreszenz.

Lunge: Im Bindegewebe des Lungenparenchyms und in den Gefäßwänden stellten sich die elastischen Fasern blaßgrün dar; deutliche Fluoreszenz war im Lungenparenchym nicht vorhanden.

Leber: Die von Kupffer`schen Sternzellen fluoreszierten hellgelb, die zentralen Läppchenanteile leuchteten blaß. Die Leberparenchymzellen selbst zeigten keine deutliche Fluoreszenz.

Milz: Am Rand der Milzknötchen fand sich hellgelbe, körnige Fluoreszenz in einer ringförmigen Zone um das Zentrum. Reichlich goldgelbe bis rötliche Fluoreszenz fiel disseminiert in der roten Pulpa auf.

Magenschleimhaut: Im Drüsenepithel und im Bindegewebe stellten sich vereinzelte, goldgelb fluoreszierende Körnchen dar.

Dünndarm: In der Tunica mucosa war körnige Fluoreszenz vorhanden. Die Schleimhautoberfläche selbst erschien dunkel.

Dickdarm: Zwischen den Krypten fand sich blaßgelbe Fluoreszenz. Die Schleimhaut stellte sich nicht dar.

Haut: Die Haare zeigten eine intensiv gelbgrüne Fluoreszenz.

Muskulatur: Im gefäßführenden Bindegewebe zeigten sich einzelne, fluoreszierende Körnchen. Die Muskelzellen selbst fluoreszierten nicht.

Herzmuskel: An den Polen der Muskelzellkerne fanden sich feine, fluoreszierende Pünktchen.

Knochen: Faserige Strukturen im Bereich von Peri- und Endost fluoreszierten schwach grünlich. Im Knochenmark fand sich schlierig-netzartige Fluoreszenz. (Die Beurteilung der Präparate war

Niere: In den basalen Anteilen der Tubulusepithelzellen zeigte sich eine feine, goldgelb fluoreszierende Punktierung. Die Glomerula hingegen stellten sich nicht dar.

4.2 Sekundärfluoreszenz (nach Atebrin)

Gehirn: Die Fluoreszenz war gegenüber den Primärfluoreszenzpräparaten quantitativ wie auch qualitativ nicht verändert; sie war auch in den gleichen Rindenschichten lokalisiert.

Lunge: Im Gegensatz zu den Primärfluoreszenzpräparaten fluoreszierte das Zytoplasma der Alveolarepithelzellen kräftig gelb-grün; die Zellkerne waren hingegen dunkel ausgespart. Perivaskulär fanden sich Zellen mit goldgelber, körniger Fluoreszenz.

Leber: Es zeigte sich vermehrt grünliche, feinsttropfige Fluoreszenz, die in den Leberparenchymzellen der zentralen Läppchenanteile an den Zellgrenzen lokalisiert war.

Milz: Im Vergleich mit den Primärfluoreszenzpräparaten war kein wesentlicher Unterschied festzustellen; die Fluoreszenz erschien ebenso bunt.

Magen: Es fiel auf, dass die Kerne der Schleimhautepithelzellen sowie die der Bindegewebs- und Muskulariszellen blaßgrün leuchteten. Vermehrt hellgelbe, feinkörnige Fluoreszenz fand sich außerdem in den Zellen des Interstitiums, besonders am Grunde der Fundusdrüsen.

Dünndarm: Im Stroma der basalen Zottenanteile helle bis goldgelbe, mehr feintropfige Fluoreszenz; in der Schleimhaut selbst war sie nicht vermehrt.

Dickdarm: In den Epithel- und Bindegewebszellen stellten sich die Kerne auffallend grünlich dar. Das Zytoplasma zeigte keine Fluoreszenz.

Haut: Kein wesentlicher Unterschied gegenüber den Primärfluoreszenzpräparaten.

Muskulatur: Kein wesentlicher Unterschied gegenüber den Primärfluoreszenzpräparaten.

Herz: Kein wesentlicher Unterschied gegenüber den Primärfluoreszenzpräparaten.

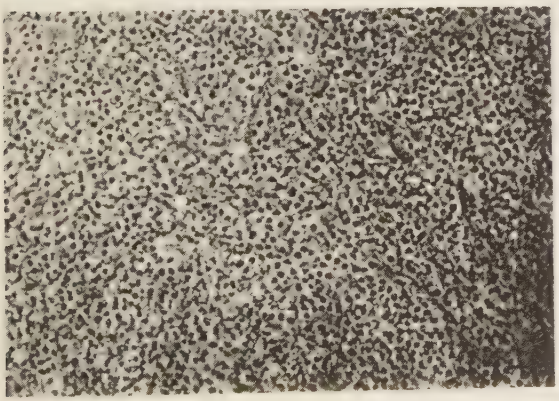
Knochen: Die faserige Fluoreszenz von Peri- und Endost glich derjenigen in den Primärfluoreszenzpräparaten. In günstigen Schnitten fluoreszierten auch die Osteozyten; außerdem fanden sich im Knochenmark reichlich Zellen mit deutlich fluoreszierenden Kernen.

Niere: Es fand sich eine kräftige,hellgrüne Fluoreszenz, die sich von den Primärfluoreszenzpräparaten unterschied: Die Kerne von Tubulus- und Glomerulumzellen leuchteten elektiv, stellenweise wie bestäubt. Die fixierten, ungefärbt eingedeckten Präparate ließen die gleichen Befunde erkennen. Unterschiede gegenüber den unfixiert gefriergeschnittenen Präparaten waren gering und qualitativer Art: Die Fluoreszenz erschien mehr homogen, körnige Strukturen fehlten ganz.

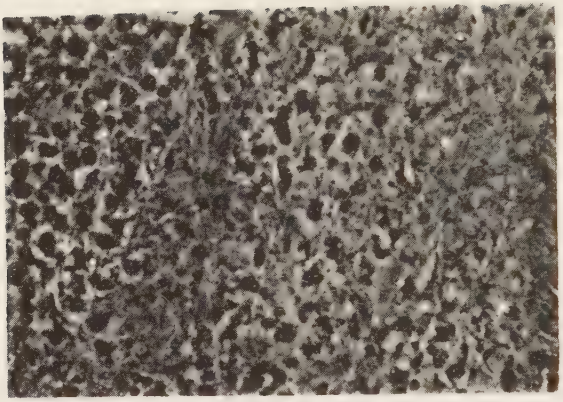
4.3 Sekundärfluoreszenz experimenteller Tumoren

YOSHIDA-Sarkom:

Es handelt sich um ein Rundzellsarkom. Die Zellkerne leuchteten blaßgrün; das Zytoplasma ließ in keinem der Präparate eine Fluoreszenz erkennen.



1 a



1 b

Abb. 1 a und b
YOSHIDA-Sarkom; 9 Tage nach s. c. Implantation und Vorbehandlung mit Atebrin; phasenkontrast-fluoreszenzmikroskopische Aufnahme. Vergr. 190-fach (a), 480-fach (b)

JENSEN-Sarkom:
Es handelt sich um ein polymorphzelliges Sarkom. Weder im Zytoplasma noch in den Kernen der Tumorzellen zeigte sich Fluoreszenz. Im Stroma fand sich ein blaß-diffuses Leuchten.

WALKER-BASF-Sarkom:
Es handelt sich um ein polymorphzelliges Sarkom. Im Bereich des gesamten Tumors war mikroskopisch keine Fluoreszenz nachzuweisen.

EHRLICH-Carcinom:
Es handelt sich um ein medullär wachsendes Carcinom. Das Zytoplasma der Tumorzellen leuchtete schwach, die Zellkerne leuchteten etwas stärker grünlich. Besonders infiltrierend zwischen die Muskulatur gewachsene Tumoranteile zeigten gering gelb-grünliche Fluoreszenz.

CROCKER-Sarkom 180:
Es handelt sich um ein polymorphzelliges Sarkom. Die Kerne der Tumorzellen leuchteten etwas stärker grünlich als das Zytoplasma; auffällige Fluoreszenz fand sich nicht.

Lymphosarkom 4946:
Es handelt sich um ein Lymphosarkom. Die Tumorzellkerne leuchteten schwach grünlich; in vereinzelten Bezirken zeigten auch die Zellkerne Fluoreszenz.

Insgesamt war die Fluoreszenz in den Tumorpräparaten, sofern überhaupt vorhanden, deutlich schwächer als in den zuvor untersuchten Präparaten von normalen Körpergeweben.

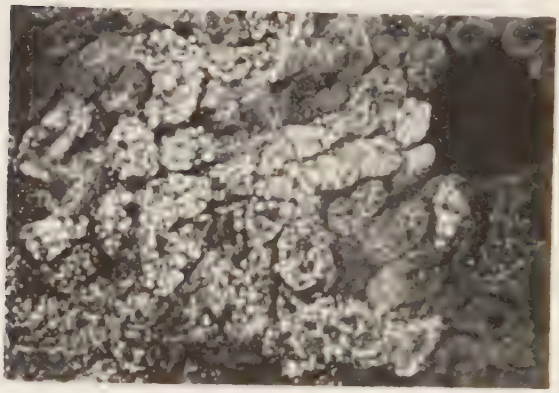
4.4 Sekundärfluoreszenz nach Gewebeschädigung

4.4.1 Vigantol:
In den Präparaten von Lunge, Magenschleimhaut und Nieren zeigten sich Kalkniederschläge in den fixierten gefärbten, sowie in den unfixierten Gefrierschnitten bei Phasenkontrastbeleuchtung. In der Lunge handelte es sich um perivasculäre, fleckförmige Verkalkungsherde, in der Magenschleimhaut waren die mittleren Bereiche der Drüsenschläuche von Kalkniederschlägen durchsetzt. In den Nierenpräparaten war das Tubuluslumen stellenweise von ausgefällten Kalksalzen vollgestopft.

In den Präparaten von Herz, Leber, Milz, Dünndarm, Dickdarm und Knochen konnten Verkalkungen in den fixierten gefärbten Präparaten, sowie in den unfixiert gefriergeschnittenen phasenkontrastoptisch nicht festgestellt werden.

Fluoreszenzoptisch waren die Befunde wie folgt:
Lunge: Gegenüber den Primärfluoreszenzpräparaten leicht vermehrt bröckchenartige Fluoreszenz, besonders im perivasculären Bindegewebe.
Magen: Gegenüber den Primärfluoreszenzpräparaten kein wesentlicher Unterschied.

Niere: Einzelne Tubuli erschienen wie vollgestopft mit fluoreszierendem Material. Die Fluoreszenz war in radiären Streifen zum Nierenbecken hin, entsprechend dem Verlauf der Sammelrohre, angeordnet, zentral intensiver als peripher.



2 a

2 b

Abb. 2 a und b

Rattenniere: 12 Tage nach i. m. Injektion von Vigantol und zusätzlicher Applikation von Atebrin über 2 Tage; phasenkontrast-fluoreszenz-mikroskopische Aufnahme.

Vergr. 480-fach

4.4.2 Tetrachlorkohlenstoff

Magen: Bei Phasenkontrastbeleuchtung und im Hämatoxilin-Eosin gefärbten Präparat zeigten sich keine auffälligen pathologischen Veränderungen. Beim Vergleich mit den Sekundärfluoreszenzpräparaten war die Fluoreszenz farblich, quantitativ und bezüglich der Lokalisation nicht verändert.

Leber: Im Hämatoxilin-Eosin gefärbten Präparat zeigten alle zentral gelegenen Leberzellen großvacuolige Auftreibung. Die Zellkerne waren an die Randpartie gedrängt, vom Zytoplasma war z. T. nur noch ein schwach angefärbter, dünner Saum zu erkennen. Azinusperipher waren Leberzellen z. T. normal strukturiert und erhalten. Insgesamt handelte es sich um eine großtropfige, vorwiegend azinuszentral gelegene Leberzellverfettung. Im UV-Licht zeigte sich in den entsprechenden Bezirken vermehrt eine blaßgrüne, großtropfige Fluoreszenz, keine dagegen in der Läppchenperipherie.

Niere: Bei Phasenkontrastbeleuchtung und im Hämatoxilin-Eosin gefärbten Präparat zeigten sich keine auffälligen pathologischen Veränderungen. Im UV-Licht fand sich eine kräftige, hellgrüne Fluoreszenz der Kerne von Tubulus- und Sammelrohrepithelzellen. Im Gegensatz zur Sekundärfluoreszenz ohne vorherige Schädigung fluoreszierten die Glomerulumzellkerne nicht.

4.4.3 Calciumchlorid

Muskel: Im Hämatoxilin-Eosin gefärbten Präparat zeigten sich Kalksalzniederschläge als basische, dunkelblau angefärbte, fleckförmige Einlagerungen in die Muskulatur. In diesen Bereichen waren die angrenzenden Muskelzellen nekrotisch. Fluoreszenzoptisch zeigten sich dunkle Bezirke innerhalb schwach grünlich leuchtender Muskulatur, an deren Rand zellreiches Gewebe mit grünlich fluoreszierenden Kernen auffiel.

4.4.4 Vereisen mit Kohlensäureschnee

Bei den untersuchten Organen fielen in den Hämatoxilin-Eosin-gefärbten Präparaten nekrotische Bezirke durch starke Eosinophilie des Zellplasmas, verminderte Kernfärbbarkeit und Unschärfe der Zellgrenzen auf; die Randzonen dieser Gebiete waren kleinzellig infiltriert. Bei Phasenkontrastbeleuchtung fanden sich keine besonders auffälligen Veränderungen.

Vermehrte Sekundärfluoreszenz zeigten im einzelnen folgende Organe:

Magen: In den Stromazellen am Grund der Fundusdrüsen auffallende, hellgelbe Fluoreszenz; andere Magenabschnitte der gleichen Präparate waren wiederum nicht so brilliant angefärbt.

Dünndarm: Die nekrotischen Bezirke waren auffallend dunkel, dagegen fand sich in den Randbezirken vermehrte, goldgelbe Fluoreszenz.

Dickdarm: Ebenfalls in den Randzonen der nekrotischen Bezirke zeigte sich leicht vermehrte Fluoreszenz. Die Veränderungen waren hier etwas weniger auffällig.

Niere: Bei den Präparaten fielen annähernd keilförmige, dunkel ausgesparte Bezirke der Nierenrinde auf, in deren Randzonen sich vermehrt körnige Fluoreszenz fand.

4.4.5 Ischämie

In den Präparaten der Nieren, deren Gefäßpole 30 Minuten lang abgeklemmt worden waren, fanden sich weder im gefärbten Präparat noch bei Phasenkontrastbeleuchtung wesentlich pathologische Veränderungen; auch fluoreszenzoptisch konnten auffällige Veränderungen nicht festgestellt werden.

Tabelle 1

Versuch	Ergebnis		Bemerkung
	positiv	negativ	
Primär - fluoresz.		*	
Sekundär-fluoresz. (ohne Schädig.)	Lunge Leber Magen Dickdarm Dünndarm Niere	Gehirn Milz Muskel Herz Haut	Kernfluoreszenz außer in Lunge und Leber
Sekundär-fluoresz. (Tumoren)	EHRLICH L 4946 CROCKER	YOSHIDA JENSEN WALKER	Nur Stromazellen u. die nur gering pos.
Sekundär-fluoresz. (nach Schäd.) Vit. D_3	Niere Lunge	Leber Milz Magen Dünndarm Dickdarm	Verkalkungen nicht gleich Fluoreszenz
CCl_4	Leber Niere	Magen	
$CaCl_2$	Muskel	entfällt	
CO_2 - Schnee	Magen Dünndarm Dickdarm Niere	—	Kernfluoreszenz nur im Bereich entzündlicher Infiltrate.

* Die Primärfluoreszenz wird, um den Unterschied zur Sekundärfluoreszenz hervorzuheben, in der Tabelle als "negativ" bezeichnet, obwohl alle untersuchten Organe mehr oder weniger Eigenfluoreszenz zeigten.

5 Diskussion

In den vorliegenden Versuchen wurde eine Klärung der folgenden Fragen angestrebt:

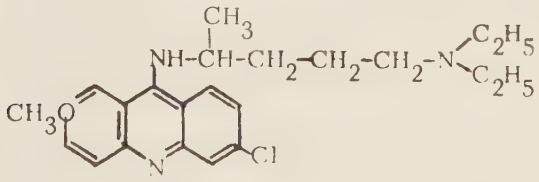
1. Welche Organe zeigen Primärfluoreszenz ?
2. Wie und in welchen Geweben kann Sekundärfluoreszenz durch Atebrin hervorgerufen werden ?
3. Nehmen experimentelle Tumoren intravital verabreichtes Atebrin auf und wie speichern sie es gegebenenfalls ?
4. Zeigen Nekrosen eine vermehrte Atebrinaufnahme und -fluoreszenz ?

Fluoreszenz zeigten in verschiedenem Ausmaß sämtliche untersuchten Organe auch ohne vorherige Applikation eines Fluorochroms. Es handelte sich hierbei um die Primär- oder Eigenfluoreszenz der verschiedenen Gewebe. Welche Strukturenbzw. welche chemischen Substanzen in der Zelle für die Primärfluoreszenz verantwortlich sind, hat HAMPERL 1936 in seiner Arbeit "Die Fluoreszenzmikroskopie menschlicher Gewebe" untersucht. Danach kommen vor allem die sogenannten Abnutzungspigmente, insbesondere das Lipofuscin, als Ursache für die Eigenfluoreszenz in Frage. HAMPERL hat sie u. a. in Ganglienzellen des Gehirns, in der Muskulatur und in der Leber nachgewiesen. Wenn man von Unterschieden in der farblichen Qualität dieser von HAMPERL beobachteten Fluoreszenz absieht, die auf den Gebrauch anderer Filterkombinationen zurückgeführt werden kann, ergaben sich bei unseren Präparaten, obschon von tierischen Organen gewonnen, im wesentlichen die gleichen Befunde.

Von dieser Primärfluoreszenz mußte nun die Sekundärfluoreszenz nach oraler Gabe von Atebrin unterschieden werden. Das war in einzelnen Fällen ohne weiteres möglich, dann nämlich, wenn die Gewebe eine große Affinität zu Atebrin aufwiesen und die Fluoreszenz sich dementsprechend deutlich von der Eigenfluoreszenz

unterschied. In anderen Fällen bestand nur eine geringe Differenz in der Intensität zwischen Primär- und Sekundärfluoreszenz; dann war naturgemäß auch die Unterscheidung schwierig. Anders als die Primärfluoreszenz zeigte sich die Sekundärfluoreszenz nach oraler Atebrinapplikation nicht in allen von uns untersuchten Geweben. Welche Gegebenheiten ihr Auftreten ermöglichen bzw. fördern können, soll nachfolgend diskutiert werden.

Atebrin ist chemisch ein Akridinderivat. Der aus



drei konjugierten Ringen zusammengesetzte Akridinkern besitzt, wie andere ähnliche Verbindungen, die Fähigkeit zu fluoreszieren, aber erst die Art der Substituenten an den Ringen und der Seitenkette bestimmt, in welche Gewebe das Fluorochrom besonders aufgenommen wird (ACKERMANN). Nach diesem Autor ist die Atebrinkonzentration am stärksten in der Leber, der Milz und in der Lunge, gering im Gehirn und im Knochenmark. Wird Atebrin aber mit Tritium markiert, zeigt es hingegen gerade im Gehirn und im Knochenmark scintigraphisch die stärkste Aktivität (YOUNG).

Atebrin verursacht auch nicht in allen Geweben die gleiche Fluoreszenz. Das hängt nicht nur von den verschiedenen Stoffwechselleistungen der einzelnen Zellen ab, sondern auch von der Applikationsart. Wird es z. B. parenteral gegeben, dann verteilt es sich so, dass sich die Konzentrationen in Lunge, Leber und Niere wie 3:2:1 verhalten, wird es aber oral gegeben, dann ist das Verhältnis der entsprechenden Konzentration nach Resorp-

tion des Fluorochroms 1:1:10 (BRILMAYER)

Auch innerhalb der Zelle wird Atebrin verschieden verteilt; nur so sind die recht unterschiedlichen Befunde zu erklären: einmal nämlich zeigt sich Fluoreszenz mehr im Zytoplasma, das andere Mal nur im Kern. Nach BASTOS kann man die verschiedenen Fluoreszenzerscheinungen in drei Gruppen einteilen: 1. Fluoreszenz in Form grober gelber oder grüner zytoplasmatischer Granula, 2. in Form kleiner verstreuter weißer zytoplasmatischer Partikel, und 3. homogene Fluoreszenz der ganzen Zelle, oder homogene Fluoreszenz nur des Kerns. Das Atebrin hat demnach eine unterschiedliche Affinität zu den verschiedenen zytoplasmatischen Strukturen, wie Mito- oder Lipochondrien (ARONSON, WITTE, WOLF), zytoplasmatischer Ribonukleinsäure (von BERTALANFFY und BICKIS) oder Lipideinschlüssen (VINEGAR). Es ist die unterschiedliche Anhäufung in den einzelnen Geweben entsprechend dem unterschiedlichen Gehalt ihrer Zellen an den einzelnen Strukturen somit offenbar von der Zusammensetzung des Zytoplasmas abhängig.

Wie Untersuchungen über die therapeutische Wirksamkeit des Atebrin bei "DNS-Überempfindlichkeit" (Erythematodes) gezeigt haben, reagiert es auch mit Desoxyribonukleinsäure, und zwar in einem stöchiometrischen Verhältnis: Vier Nukleotidmoleküle verbinden sich mit einem Atebrinmolekül (KURNICK). Dabei zeigte sich, dass die Nukleotid-Atebrinverbindung ein anderes Adsorptionsspektrum besitzt als das Atebrin allein. Das Emissionsspektrum scheint sich nicht zu ändern, wenn Atebrin mit DNS eine chemische Verbindung eingeht, denn die von uns beobachtete grungelbe Fluoreszenz der Zellkerne entspricht ziemlich genau einer Wellenlänge von 500 mμ. Normalerweise wird das Atebrinmolekül bei Wellenlängen von 285 und 420 mμ maximal aktiviert. Fluoreszenzlicht wird dann mit einer Wellenlänge von 500 mμ emittiert (UDENFRIEND). Durch die Sperrfilter in unserem Fluoreszenzmikroskop wurden Wellenlängen unterhalb 410 mμ vollständig

die spezifische Atebrinfluoreszenz durchgelassen wurde).

Wenn man als gegeben voraussetzt, dass Tumorgewebe vermehrt Atebrin aufzunehmen und zu speichern vermag, gibt es theoretisch mehrere Möglichkeiten des Tumornachweises:

1. Zugeführter Farbstoff verschwindet schneller aus der Blutbahn; die Ausscheidung im Harn ändert sich hinsichtlich Dauer und ausgeschiedener Menge. Untersuchungen, bei denen die Ausscheidungszeit oder -menge intravenös zugeführten Atebrins beurteilt wurden, gehen zurück auf BECKER, BINGOLD, BRILMAYER u. a.

2. Der Farbstoff wird im Tumorgewebe durch seine Fluoreszenz direkt nachgewiesen; die Fluoreszenz von Operationspräparaten, oder Zellausstrichen wird makroskopisch oder mikroskopisch beurteilt, untersucht von ACKERMANN, BASTOS, HENNING. WITTE u. a. Eine Anreicherung von Atebrin im Gewebe maligner Tumoren ist von diesen Autoren beobachtet worden. Das wird mit der Affinität von Atebrin zu den Nukleotiden und dem Reichtum der Tumorzellen an solchen in Zusammenhang gebracht (ADERHOLD). Diese Ergebnisse werden von anderen Autoren allerdings angezweifelt (WEISSBERG, YOUNG). So beobachtete z. B. WEISSBERG eine Atebrinfluoreszenz nur im entzündlichen Exsudat, nie aber in Tumorzellen.

Zusammengefasst ergeben die eigenen Untersuchungen:

1. Tumorgewebe unterscheidet sich bezüglich seiner Fähigkeit, Atebrin aufzunehmen und zu speichern, nicht wesentlich von normalem Gewebe.
2. Im Granulationsgewebe am Rand nekrotischer Bezirke ist vermehrt Fluoreszenz vorhanden.
3. Die Aufnahme und Speicherung von Atebrin ist an eine intakte Zellfunktion gebunden.

Die Methode der intravitalen Fluorochromierung mit Atebrin ist unseres Erachtens zur Tumordiagnostik nicht geeignet. Wenn sie

dazu dienen sollte, z. B. in Reihenuntersuchungen eine Auslese zwischen gut- und bösartigen Zellen zu treffen, müsste die Möglichkeit einer weitgehend einwandfreien Unterscheidung gefordert werden. Zwar wird der Farbstoff auch in das Gewebe mancher transplantierter Neoplasmen bei Ratten und Mäusen aufgenommen, doch konnte in keinem Fall mikroskopisch eine gegenüber normalen Zellen so vermehrte Fluoreszenz festgestellt werden, dass eine Unterscheidung zwischen Tumor- und normalen Zellen allein aufgrund der Atebrinfluoreszenz möglich gewesen wäre.

Hingegen lässt die Fluoreszenz nach intravitaler Fluorochromierung mit Atebrin in geschädigten Geweben Rückschlüsse auf den Grad der Zellschädigung zu. Nekrotisches Gewebe zeigt keinerlei Fluoreszenz; das zeigten die Versuche, in denen durch Vereisen mit Kohlensäureschnee örtliche Kältenekrosen und durch lokale Kalziumchlorid-Injektionen Muskelnekrosen erzeugt worden waren. Hier trat Fluoreszenz nur am Rand der schwer geschädigten Bezirke auf. Offenbar wird das Atebrin von fixen Bindegewebszellen und Leukozyten aufgenommen, zumal es infolge lokaler Hyperämie sicher reichlich antransportiert wird und mit dem Exsudat das Gefäßsystem verlässt. Auch für die bescheidene Fluoreszenz der Tumoren könnte das gelten, wie weiter oben (WEISSBERG) bereits erwähnt.

Sind Zellen dagegen nur soweit geschädigt, dass ihre Funktion darunter leidet, sie aber noch regenerationsfähig sind, kann Fluoreszenz vermehrt im Zytoplasma auftreten. Das war der Fall bei den Präparaten der durch Tetrachlorkohlenstoff geschädigten Lebern, in deren Zellen das Zytoplasma stärker fluoreszierte. Bei gestörter Leberzellfunktion wird offensichtlich auch Atebrin nicht regelrecht ausgeschieden, bleibt vermehrt in der Zelle und verursacht eine stärkere Fluoreszenz. Ähnlich die Nierenpräparate der gleichen Versuche: In den normalen Nieren war eine auffällige

Sekundärfluoreszenz der Kerne von Glomerulum- und Tubuluszellen zu beobachten gewesen. Nach Schädigung mit Tetrachlorkohlenstoff war Kernfluoreszenz nur noch gering oder gar nicht mehr vorhanden; dagegen zeigte sich im Zytoplasma der Tubuluszellen jetzt eine deutliche Atebrinfluoreszenz. Das lässt auf eine schwere Schädigung des Kernstoffwechsels, der gegen Noxen sehr empfindlich ist, schliessen: Obwohl in den gefärbten Präparaten Anzeichen einer Chromatolyse noch nicht vorhanden waren, ist es wahrscheinlich zu einer Emigration von Nukleotiden in das Zytoplasma gekommen, wo sie sich mit Atebrinmolekülen verbunden haben könnten. Die vermehrte Fluoreszenz der Tubuluszellen ist somit als Ausdruck einer nach Schädigung stärkeren Konzentration von Desoxyribonukleinsäuren im Zytoplasma zu werten.

Einige Schwierigkeiten bei der Beurteilung unserer Fluoreszenzpräparate, die den Wert der Untersuchungsmethode einschränken können, müssen noch erwähnt werden: Gefrierschnitte und unfixierte, ungefärbte Schnitte müssen in fluoreszenzfreien Eindeckmitteln eingeschlossen werden, z. B. GURRs Univert-Mountant oder physiologischer Kochsalzlösung (mit Wachs umrandet). Der pH-Wert des Eindeckmittels muss zwischen 7 und 7,4 liegen. Weiterhin müssen die Gefrierschnitte gleich dick geschnitten sein, denn je dicker das Präparat ist, desto mehr Erregerstrahlung wird absorbiert, das mikroskopische Bild erscheint dunkler und eine feine Fluoreszenz kann übersehen werden. Der entscheidende Nachteil scheint uns aber darin zu liegen, dass sich aufgrund des subjektiven Eindrucks nach einiger Übung eine durch Atebrin hervorgerufene Fluoreszenz in vielen Fällen wohl erkennen, nicht aber mit objektiven Maßstäben messen lässt. Selbst eine Klassifizierung der Sekundärfluoreszenz in verschiedene Intensitätsgrade erscheint nicht möglich, da zu viele Faktoren das Erscheinungsbild der Fluoreszenz beeinflussen und variieren.

Zur Eignung für eine klinische Routineanwendung bedarf es aber konstanter Kriterien, die eine systematische Einteilung der verschiedenen Fluoreszenzformen ermöglichen.

6 Zusammenfassung

Im Tierversuch wurden Untersuchungen über die intravitale Fluorochromierung mit Atebrin, einem Akridinfarbstoff, angestellt. Es wurde beurteilt:

1. welche Organe Primärfluoreszenz zeigen,
2. wie und in welchen Geweben Sekundärfluoreszenz durch Atebrin hervorgerufen werden kann,
3. ob experimentelle Tumoren den intravital verabreichten Farbstoff aufnehmen und gegebenenfalls speichern, und
4. ob Nekrosen eine vermehrte Atebrinaufnahme und -fluoreszenz zeigen.

Die Präparate wurden unfixiert gefriergeschnitten sowie in Alkohol fixiert in einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

Eine elektive Atebrinaufnahme in das Gewebe experimenteller Tumoren bei Ratten konnte nicht nachgewiesen werden; vielmehr zeigten die Tumorpräparate geringere Fluoreszenz als andere gesunde oder geschädigte Gewebe. Besondere Affinität zu Atebrin zeigten die Präparate von Lunge, weniger Leber, Magen und Dünndarm. Das Fluorochrom wurde vorzugsweise in die Zellkerne aufgenommen, wo es mit den Purinkörpern eine Verbindung einzugehen scheint. Am Rand von künstlich gesetzten Nekrosen zeigte sich vermehrt, in weniger geschädigten Gewebsbezirken vermindert Fluoreszenz. Primärfluoreszenz zeigten, wie in der Literatur bekannt, mehr oder weniger alle untersuchten Organe.

Die intravitale Fluorochromierung mit Atebrin ist nach den vorliegenden Untersuchungen als klinisch brauchbare Routinemethode zur Unterscheidung gut- und bösartiger Zellen im mikroskopischen Präparat nicht geeignet.

7 Literaturverzeichnis

ACKERMANN, N. B., D. K. HALDORSEN, D. L. WALLACE, D. L. MADSON, A. S. McFEE — Aminoacridine uptake by experimental tumors JAMA 191, II 103-4 (65)

ACKERMANN, N. B. et al. — Localization of aminoacridine fluorescence in lung tumors of rats JAMA 187, 832-3(64)

ADERHOLD, K. — Zur Frage der klinischen Verwendbarkeit der Fluorochromierung maligner Tumorzellen zum Zwecke der Früh-und Differentialdiagnostik BRUNs Beitr. klin. Chir. 186, 385-99(53)

ADERHOLD, K. — Über die Messung der Fluorochromausscheidung im Harn nach intravenöser Atebrinverabfolgung als Methode der Früh-und Differentialdiagnostik der malignen Tumoren Zbl. Chir. 78, 1282-7 (53)

BASTOS, A. L. — Intravital fluorescence in tumor cells Acta Cytologica (Baltimore) 10, 187-90 (66)

BECKER, Th., Fr. W. STORCK — Über den Nachweis fluoreszierender Farbstoffe im menschlichen Harn und Serum zur Frühdiagnostik bösartiger Tumoren Zbl. Chir. 77, 2384-8 (52)

BERTALANFFY, L. v. L. BICKIS — Identification of cytoplasmatic basophilia(RNA) by fluorescence mikroskopy J. Histochem. Cytochem. 4, 481-93 (56)

BINGOLD, K., C. BRILMAYER, A. MACK — Die Atebrinausscheidung im Harn als Diagnostikum maligner Tumoren Krebsarzt (Wien) 10, 1-12 (55)

BRILMAYER, C., A. KOHLER, A. MACK — Trypaflavinbestimmung im Harn und ihre Anwendung neben Atebrin und Eosin in der Tumordiagnose Zschr.f.d. ges. experi. Med. 122, 549-63 (54)

BRILMAYER, C. E. KUGELE, A. MACK — Die chromophile Eigenschaft des Lungengewebes für Atebrin unter besonderer Berücksichtigung von malignen Neubildungen Ärzt. Forschung 9, 353-7 (55)

ELLINGER, Ph., A. HIRT — Mikroskopische Untersuchungen an lebenden Organen Arch. exper. Path. 145, 193-210 (29)

ELLINGER, Ph., A. HIRT — Mikroskopische Untersuchungen an lebenden Organen Arch. exper. Path. 150, 285-97 (30)

HAMPERL, H. — Die Fluoreszenzmikroskopie menschlicher Gewebe. Virchows Arch. Pathol. Anat. 292 I,1-51 (34)

HAMPERL. H. — Fluoreszenzmikroskopie M. M. W. 97 II, 1121-5 (55)

HENNING, N., K. HEINKEL, S. WITTE — Acridin-und Atebrinintravitalfluorochromierung als Hilfsmittel bei der Gastrocytologie M. M. W. 108 I, 1-8 (66)

KURNICK, N. B. — Reaction between DNA and Quinacrine and other Antimalarials J. Lab. Clin. Med. 60, 669-88 (62)

UDENFRIEND, S., D. E. DUGGAN, B. M. VASTA, B. B. BRODIE — A spectrophotofluorometric study of organic compounds of pharmacological interest J. Pharmacol. Exptl. Therap. 120, 26-32 (57)

VINEGAR, R. Metachromatic differential fluorochroming of living and dead ascites tumor cells with acridin orange Cancer Res. 16, 900-6 (56)

WEISSBERG, M. Resorption und Ausscheidung fluoreszierender Substanzen Zschr. f. Krebsforschung 62, 668-674 (59)

WITTE, S. Cytodiagnostik mit Hilfe einer Fluorochromierung in vivo Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 61, 254-6 (55)

WOLF, M.K., S.B. ARONSON Growth, fluorescence and metachromasy of cells cultured in presence of acridin orange J. Histochem. Cytochem. 9, 22-29 (61)

YOUNG, J.M. et al. Studies of the uptake of tritium labelled mepacrine by tumors Brit. J. Cancer 19, 370-8 (65)

Herrn Privatdozent Dr. med. K. Hupe danke ich für das Thema der vorliegenden Arbeit und die stets gern gewährte Unterstützung und Beratung bei der Anfertigung der Dissertation.

Lebenslauf

Am 2. 12. 1942 wurde ich als erster Sohn des Dr. med. Oskar Helbing und seiner Ehefrau Anna-Elisabeth, geb. Klaus, in Krakau, Polen, geboren. 1944 zogen wir nach Freiberg in Sachsen

Im März 1945 flohen wir nach Eschwege. Dorthin folgte uns mein Vater nach seiner Entlassung aus amerikanischer Kriegsgefangenschaft.

Ostern 1949 wurde ich eingeschult und besuchte vier Jahre lang die Volksschule in Eschwege. 1953 erfolgte die Aufnahme in die Sexta des dortigen Gymnasiums, welches ich bis zum Abschluß durch die Reifeprüfung 1962 - die letzten drei Jahre im neusprachlichen Zweig - besuchte.

Im Sommersemester 1962 begann ich das Medizinstudium in Erlangen, wo ich im März 1963 die naturwissenschaftliche Vorprüfung ablegte. Vom Sommersemester 1963 an studierte ich in Marburg; dort bestand ich im Oktober 1964 die ärztliche Vorprüfung. Auch den klinischen Teil des Studiums absolvierte ich in Marburg, mit Ausnahme des Sommersemesters 1965, das ich in Kiel verbrachte.

Im Juli 1967 wurde ich zur ärztlichen Prüfung zugelassen, die ich bis zum 8. Januar 1968 vollständig ablegen konnte.

Gerd Helbing
Eschwege

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren
und Dozenten

in Marburg:
Amon, Beckmann, Berendes, Bommer, Braun-Falco, Brück,
Buchholz, Bücher, Cleve, Deicher, Delbrück, Dölle, du Mesnil
de Rochemont, Exner, Gedigk, Golenhofen, Hamm, Hardewig,
Hensel, Heuser, Hildebrandt, Hohorst, Jacob, Karlson,
Klingenberg, Knauff, Lang, Lang, Lehmann-Grube, Linneweh,
Löhr, Lübbers, Mann, Martini, Marx, Neubauer, Peters,
Petry, Petzold, Rodeck, Rohen, Schiff, Schimassek, Schleyer, Schmid,
Schmidt, Schrappe, Schultze, Schürmann, Schwaiger, Sauer,
Siegert, Siess, Spiegelberg, Staib, Streicher, Strohmeyer, Würtele.

in Erlangen:
Bauer, Fießelmann, Fleischmann, Haustein, Leonhardt,
Meuwsen, Schwemmle, Stammer, Wegener.

in Kiel:
Bernsmeier, Brunck, Caesar, Gärtner, Huber, Knote, Lennert,
Löhr, Lüllmann, Merkel, Pau, Staemmler.